Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin
(Leiter: Prof. Dr. Hinsberg)

Ueber den Einfluß von Pufferlösungen, Natrium cholat, Pyridin, Alkohol, Porphyrin und Hämin auf die Autoxydation der Leinölsäure

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des
Medizinischen Doktorgrades

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin

vorgelegt von

Günter Lahn
aus Berlin

Tag der Promotion: 17. 2. 1939

Druck: Karl u. Richard Hoffmann, Bln.-Charlottenburg Schillerstr. 44.

M 478

Gedruckt mit Genehmigung

der

Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr Siebeck.
Referent: Prof. Dr. Hinsberg
Korreferent: Prof. Dr. Lohmann

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

M 478

Nach den Kohlehydraten sind die Fette das wichtigste energieliefernde Nahrungsmittel. Der wesentliche Bestandteil der Fette sind die Fettsäuren, mit meistens 18 C-Atomen im Molekül, die im Organismus im Endeffekt zu Kohlendioxyd und Wassser verbrannt werden, wobei die hierbei gebildete Wärme dem Körper zur Befriedigung seines Energiebedarfes dient. Für die Stearin- und Palmitinsäure ist bekannt, daß sie durch die sog. β-Oxydation abgebaut, d. h. daß immer 2 C-Atome abgesprengt werden und so zum Schluß das ganze Molekül der Oxydation anheimgefallen ist. Dies Ergebnis wurde durch Verfütterung von phenylsubstituierten Fettsäuren gefunden, bei denen im Harn als unverbrennliche Abbauprodukte Benzoesäure bzw. Phenylesssigsäure erscheint. Verfüttert man aber reine aliphatische Fettsäuren, so kann man zeigen, wie es besonders von der Schule V e r k a d e dargetan worden ist, daß die Oxydation nicht nur am Ende der Carboxylgruppe beginnt, sondern auch an der entgegengesetzten Methylgruppe, und daß dabei Dicarbonsäuren entstehen, die je nach ihrer Konstitution mehr oder weniger in den Harn ausgeschieden werden.

Neben diesen beiden gesicherten Abbauwegen scheint sich der Organismus noch eines dritten zu bedienen, indem er nämlich aus den gesättigten Fettsäuren ungesättigte macht und es ist wiederholt diskutiert worden, welche Rolle diese Dehydrierung im physiologischen Fettstoffwechsel spielt. Teils glaubte man, daß sie der erste Angriff bei der totalen Verbrennung der Fettsäuren sei, teils ist vermutet worden, daß durch die Dehydrierung die notwendigen Vorstadien für den Uebergang von Fett in Kohlehydrate hergestellt würden, Dies ist aber weder notwendig, noch absolut sicher bewiesen. Es kommt hinzu, daß einige sehr wichtige ungesättigte Fettsäuren, die vornehmlich in den Lipoiden vorkommen, nicht vom Organismus

selber gebildet werden, und daher keine Zwischenprodukte bei dem natürlichen Abbau darstellen können. Hierzu gehört die Linol- und die Linolensäure, denen folgende Konstitution zugesprochen wird:

1) $CH_3 . (CH_2)_4 . CH = CH . CH_2 . CH = CH . (CH_2)_7 . COOH$

2) $CH_3 . CH_2 . CH = CH . CH_2 . CH = CH , CH_2 . CH = CH(CH_2)_7 . COOH$

Mit der Frage der Notwendigkeit von Linol- und Linolensäure in der Nahrung haben sich seit 1929 besonders Evans und Burr u. a. beschäftigt und in Rattenversuchen gezeigt, daß in einer Nahrung, welche diese Säuren nicht enthält, eine Nekrose des Schwanzes und Hämorrhagien der Pfoten auftreten, Erscheinungen, die durch 78 mg Fettsäure pro die der oben genannten Säuren geheilt, bzw. vermieden werden können. Weder Butter noch Oelsäure, noch die der Linolsäure isomere Elastearinsäure haben diesen Effekt, sodaß mit einer spezifischen Wirkung gerechnet werden muß. Von Evans wird deshalb die Linol- und die Linolensäure als das Vitamin F_1 bezeichnet. Auch von Skraup ist in interessanter Weise gezeigt worden, daß ungesättigte Fettsäuren, in diesem Falle allerdings auch die Oelsäure, in vivo die Verbrennung gesättigter Fettsäuren katalysieren können, ohne selbst angegriffen zu werden.

Die Stelle des Moleküls, an welcher naturgemäß die Oxydation am leichtesten eintreten kann, ist die Stelle der Doppelbindungen. In Gegenwart von reinem Sauerstoff, d. h. bei der Autoxydation, nimmt man mit großer Wahrscheinlichkeit an, daß sich zuerst Peroxyde bilden, die sekundär einer Veränderung unterliegen und entweder Oxyketonsäuren entstehen lassen oder ihren Sauerstoff auf andere Moleküle übertragen, wie es z. B. bei den Versuchen von Skraup anzunehmen ist. Durch diese Möglichkeit gewinnt die Autoxydation nicht nur ein theoretisches und technisches Interesse, sondern sie könnte ebenso gut für die Biologie von Bedeutung sein, entweder für den Abbau der ungesättigten Fettsäuren selbst oder als Oxydationskatalysatoren für andere Substrate, die sonst für den Organismus schwer angreifbar sind. Die intermediäre Bildung von Peroxyden bei der Autoxydation von

Fettsäuren ist letzthin von Franke und Jerchel eingehend geprüft und sichergestellt worden, wenigstens, wenn es sich um freie Fettsäuren handelt. Von vielen anderen Autoren ist in Erkenntnis der biologischen Bedeutung der Autoxydation die Wirkung der verschiedensten Katalysatoren geprüft worden, unter denen als fördernde und biologisch wichtige das Kupfer und Eisen, die Thioverbindungen, organische Basen, ja selbst Ammoniak und auch Aminosäuren gefunden wurden. Auf die wichtige Rolle der Aminosäuren weist Franke in seinen Versuchen ausdrücklich hin und betont, daß gewisse Anzeichen dafür vorhanden sind, daß die Aminosäuren auch im Organismus eine ähnliche Rolle wie bei Modellversuchen der Autoxydationen in vitro spielen. Denn die spezifisch dynamische Wirkung nach Fettbelastung steigt bei gleichzeitiger Eiweißzufuhr erheblich stärker an und von Grafe ist diese „Luxusverbrennung" als Schutzmittel gegen die Entstehung von Fettsucht gedeutet worden.

Neben diesen vorstehend genannten fördernden Katalysatoren, die von Olcott „Prooxydantia" genannt worden sind, gibt es auch hemmende Katalysatoren oder Antioxydantia, zu denen im allgemeinen die Phenole gehören. Daneben ist an biologisch wichtigen Stoffen noch ein deutlicher Einfluß auf die Autoxydation der Leinölsäure durch Porphyrine und Hämine beschrieben worden. Und zwar haben zuletzt Hinsberg und Ammon gezeigt, daß die Porphyrine eine ausgesprochen hemmende Wirkung haben, wenn man sie bei ca. p_H 7,2 in Phosphatpuffer und bei Gegenwart von Cholsäure als Emulgator einwirken läßt. Dagegen vermißten sie eine ebenso starke Wirkung von Hämin, während von anderen Beobachtern für Hämin eine deutliche Beschleunigung in der Wirkung festgestellt wurde. Der Unterschied in der Versuchsanordnung von Hinsberg und Ammon einerseits und z. B. von Kuhn und Meyer andererseits besteht in der Zusammensetzung der Pufferlösung und der Verwendung von Pyridin-Hämin bzw. den Estern der Fettsäuren ohne Verwendung von Pufferlösung. Gerade diese Punkte, Wasserstoffionenkonzentration und Lösungsmittel sind für die katalytische Wirkung, worauf schon öfter ausdrücklich hingewiesen wor-

den ist, ausschlaggebend und es war deshalb die Aufgabe, diese Bedingungen näher zu analysieren. Und zwar sollte geprüft werden, welchen Einfluß Phosphationen, Cholationen, Citrationen, Porphyrin, Hämin, Pyridin und Alkohol auf die Autoxydation haben. Dementsprechend kamen 8 verschiedene Versuchsreihen zur Ausführung, die folgendermaßen waren:

1. **Reihe.** Standard-Lösung. Phosphatpuffer mit Na-Cholat
   Zusätze: Porphyrin in verschiedenen Konzentrationen
   Pyridin
   Alkohol

2. **Reihe.** Standard-Lösung. Phosphatpuffer ohne Na-Cholat
   Zusätze: Porphyrin
   Pyridin
   Alkohol

3. **Reihe.** A. Standard-Lösung. Citratpuffer mit Na-Cholat
   B. Standard-Lösung. Citratpuffer ohne Na-Cholat
   Zusätze: wie in Reihe 2.

4. **Reihe:** Reine Leinölsäure
   Zusätze: wie in Reihe 2.

5. **Reihe:** Standard-Lösung. Phosphatpuffer mit Na-Cholat
   Zusätze: Hämin in Phosphatpuffer und in Pyridin gelöst.

6. **Reihe:** Standard-Lösung. Phosphatpuffer ohne Na-Cholat
   Zusätze: wie Reihe 5.

7. **Reihe:** Standard-Lösung. Citratpuffer mit Na-Cholat
   Zusätze: wie Reihe 5.

8. **Reihe:** Standard-Lösung. Citratpuffer ohne Na-Cholat
   Zusätze: wie Reihe 5.

Methodik:

Auf einem schwenkbaren Blechgestell, das in einem Thermostaten von konstanter Temperatur von 37—38° C geschüttelt wurde, wurden 12 erlenmeyerkolbenähnliche, von Hinsberg und Holland angegebene Glaskölbchen angebracht. Sie sind mit Meßzylindern, die mit Sauerstoff gefüllt sind, verbunden. Diese wieder stehen in Verbindung mit einem mit NaOH gefüllten Niveaugefäß, welches dafür sorgt, daß der in den Kolben verbrauchte Sauerstoff nachströmt. An dem Wasserstand in den Meßzylindern kann der jeweilige O_2-Verbrauch abgelesen werden. In seitlichen Ansatzstück der Kölbchen befindet sich 30 %ige NaOH, die zur Aufnahme der gebildeten Kohlensäure dient.

Zur Herstellung des Versuchsgemisches wurde immer nur Leinölsäure (Schering) Mol. Gew. 280 verwendet und zur besseren Löslichmachung, und um eine feinere Verteilung der Fettsäure zu erzielen, wurde die abgemessene Menge Säure in eine Lösung von Na-Cholat gebracht. Die einzelnen Versuche liefen durchschnittlich 150—200 Stunden; morgens und abends wurden Temperatur, Barometer und Sauerstoffverbrauch vermerkt.

Um von vornherein Verunreinigungen mit positiv katalytisch wirkenden Stoffen, insbesondere mit Kupfer und Eisen zu vermeiden, wurden alle Versuchsgefäße mit heißer Salpetersäure gesäubert und hinterher mit Cu-freiem Aqua dest. bis zur neutralen Reaktion gespült. Ebenso wurde zur Herstellung aller Lösungen und Puffergemische nur Cu-freies Wasser und reinste Reagentien benutzt.

Jeder Ansatz bestand aus 2 Teilen m/2 Na-Linolat
1 Teil 18 % Na-Cholat
2 Teile ca. 3 % NaH_2PO_4.

Die Konzentration des Phosphats schwankte etwas. Sie

wurde so gewählt, daß das p_H des Gemisches immer auf 7.10—7.30 eingestellt war. Zu dem Ansatz kam dann die gleiche Menge Puffergemisch. (p_H 7.1—7.3).

Die Versuchslösung bestand aus 14 g Leinölsäure, die mit 50 ccm n Natronlauge (4 %), Cu-frei, im Meßkölbchen bis zum Klarwerden erhitzt wurde. Das so entstandene Natriumlinolat wurde nach Erkalten mit aqua dest. auf 100 ccm aufgefüllt. (= 2 Teile). Dazu kamen 50 ccm Natriumcholat (= 1 Teil).. Jetzt wurde das stark alkalisch reagierende Gemisch mit 2 Teilen NaH_2PO_4 auf das p_H 7.1—7.3 gebracht. Die so hergestellte Lösung wurde dann mit Phosphatpuffer auf 500 ccm aufgefüllt. Von dieser „Standardlösung" kamen in jedes Kölbchen 30 ccm, sodaß sich in jedem 0,84 g Leinölsäure befanden. Das seitliche Ansatzstück wurde mit 1 ccm 30 %iger, CO_2-freier Natronlauge beschickt.

Der bei einigen Versuchsreihen benutzte Citratpuffer wurde nach der Vorschrift von Sörensen hergestellt: 21.01 g Zitronensäure wurden in 200 ccm carbonatfreier n NaOH gelöst und mit H_2O auf 1000 ccm aufgefüllt. Der p_H-Wert von 7.1—7.3 wurde durch Zusatz von n/10 NaOH erreicht.

Das Photodyn (Hämatoporphyrin) stammt von den Nordmarkwerken und enthält in 1 ccm 4 mg Porphyrin. Zur Neutralisation des stark sauren Präparates wurde NaOH benutzt.

Die Jodzahl der Leinölsäure war 208. Unter der Annahme, daß 2 Mol O_2 pro Mol Leinölsäure, als Linolsäure berechnet, aufgenommen werden, ergibt sich eine theoretische O_2-Aufnahme von 134.5 ccm. Gefunden werden im Durchschnitt (sine-Werte) 120 ccm. Es liefen bei jeder Versuchsreihe 2 Kolben, die nur Puffergemisch enthielten (sine-sine-Werte) und demnach nur die durch Temperatur und Druckschwankung bedingten Volumenveränderungen anzuzeigen hatten, 2 Kolben mit Linolat ohne jeden Zusatz, die als Normalwerte (sine-Werte) in Rechnung gesetzt wurden und je 2 Kolben mit den jeweils angegebenen Zusätzen. Die Zahlen der Tabellen sind bereits die durch die sine-sine-Werte korrigierten Ablesungen und bedeuten die aufgenommene Menge Sauerstoff in ccm.

Reihe 1.. Ansatz 1: Leinölsäure, Phosphatpuffer, Na-Cholat.

Nr. d. Kolbens	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Mischung ccm	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Porphyrin mg	—	7	2	1.0	1.6	1.2	0.8	0.4	0.24	0.2	0.16	0.12	—	7	7	2.0
Pyridin ccm	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.3	0.3	0.15	0.3
Std.																
19	46	4	0	1	0	—1	0	0	0	0	0	1	35	4.5	4	0
25	50	—0.5	1	2	0	—1	0	0	0	0	0	1	47	—0.5	—1	2
42	71	1	1.5	1.5	—2	0	0	0	1	1	1	2	62	1.5	0	1
66	95	0	2	1	—1	—1	1	—1	0	0	1	4	65	1	1	1
91	104	0	1.5	1.5	0	—1	0	—1	0	0	1	—	65	0.5	0.5	1
99	108	0	1.5	2.5	0	0	1	0	1	1	2	28	69	0.5	0.5	1
114	112	0	1.5	2.5	0	0	0	0	1	2	3	71	72	1	1	2
121	113	1	1.5	2.5	1	0	1	1	2	3	4	87	72	1	1	2
138	115	0	1.5	2	1	0	1	1	3	4	5	106	74	0	0.5	2
146	117	0	1	1.5	1	0	1	1	3	4	9	113	75	2	2	1.5
170	117	0	1.5	2	1	0	1	2	4	6	17	117	76	1	1	1
186	121	0	2	2	1	1	2	2	4	15	67	122	82	1	1	2
282	123	1	1.5	2	2	1	2	2	6	40	100	—	83	1	2	1.5

Der erste Ansatz der Reihe 1 zeigt außerordentlich deutlich den hemmenden Einfluß des Porphyrins auf die Oxydation der Leinölsäure. Wenn man die Kolben 2—11 mit den Werten des Kolbens Nr. 1 (sine-Werte) vergleicht, so zeigt sich, daß das Hämatoporphyrin bis zu 0,16 mg (entspr. 0,04 ccm Photodyn) die Autoxydation noch nach rund 100 Stunden absolut hemmt, Die folgende Konzentration in Nr. 12, die dann bei allen weiteren Versuchen in den nächsten Reihen Anwendung gefunden hat und 0.12 mg Hämatoporphyrin betrug, hemmt zwar noch bis zu 66 Stunden, dann beginnt aber die Sauerstoffaufnahme und nach 106 Stunden beträgt die aufgenommene O_2-Menge schon 122 ccm gegenüber 123 ccm in Nr. 1 nach 282 Stunden. Das Pyridin, in einer Menge von 0.3 ccm der Versuchslösung allein zugesetzt, bewirkt eine deutliche Verminderung des Sauerstoffverbrauchs. Die Kolben Nr. 14, 15 und 16 weisen, wie nach den vorangegangenen Versuchen zu erwarten war, bei den angewandten Mengen Porphyrin und Pyridin nicht die geringste Sauerstoffaufnahme auf.

Reihe 1. Ansatz 2: Phosphatpuffer, Na-Cholat.

Nr. d. Kolbens	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Mischung ccm	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	
Porphyr. mg	—	0.12	—	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	—	0.12	0.12	0.12	0.
Pyridin ccm	—	—	0,3	0.3	0.2	0.1	0.05	0.03	—	—	—	—	
Alkohol ccm	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0,5	0,3	
Std.													
21	48	1	37	22	20	20	15	22	20	5	5	5	
41	71	2	62	54	50	53	48	44	40	35	32	37	
51	81	3	63	68	63	66	62	58	54	54	49	56	
67	95	4	65	87	84	88	85	83	78	82	77	93	
75	96	8	65	92	91	96	94	92	85	93	89	94	
89	104	19	65	95	97	98	104	93	99	110	104	108	1
100	108	28	69	97	101	108	109	109	104	117	111	114	1
114	112	71	72	101	102	109	111	111	111	121	116	118	1
126	114	89	72	103	105	112	113	114	115	126	121	122	1

Die in Ansatz 2 angestellten Versuche sollen die Wirkung von Pyridin und Alkohol in Gegenwart von Porphyrin zeigen. Alle Kolben werden mit der gleichen, eben noch hemmenden Menge Porphyrin (0,12 mg) beschickt, während Pyridin und Alkohol in fallenden Konzentrationen zugesetzt wurden. Hier zeigt sich in auffallender Weise, daß das Pyridin mit 0,12 mg Porphyrin die O_2-Aufnahme steigert, gegenüber sine-Porphyrin und sine-Pyridin (siehe Kolben 2, 3, 4) und damit fördernd auf die Autoxydation einwirkt. Alkohol löst dagegen kaum eine Wirkung aus, wie aus Kolben Nr. 9 zu ersehen ist. Anders dagegen Alkohol in Gegenwart von Porphyrin; hier beschleunigt er die Oxydation der Leinölsäure, wenn auch bedeutend langsamer als bei Pyridin mit Porphyrin. Nach 126 Stunden ist aber die verbrauchte Sauerstoffmenge größer als im Parallelversuch mit Pyridin.

Die Pyridinmenge ist auf den Ablauf der Autoxydation ohne Einfluß.

Reihe 2. Ansatz: Phosphatpuffer, kein Cholat.

Nr. d. Kolbens	1	2	3	4
Mischung ccm	30	30	30	30
Porphyrin mg	—	0,12	—	0 12
Pyridin ccm	—	—	0,3	0,3
Std.				
16	11	6	25	19
26	27	19,5	39	35
37	46	40	53	49
50	66	68	73	70
66	82	95	91	90
85	97	108	100	99
96	101	118	106	107
120	129	124	109	110
130	129	125	110	112
143	129	128	112	114

Die sine-Werte dieser Reihe zeigen gegenüber der Standardlösung, d. h. Phosphat + Cholat, zunächst einen geringeren Sauerstoffverbrauch, der dann aber im Laufe der Reaktionszeit bedeutend ansteigt und nach 120 Stunden die Werte der Standardlösung übertroffen hat. Während 0.12 mg Porphyrin die Autoxydation der Standardlösung bis

zu 50 Stunden absolut hemmen, tritt hier in der Lösung ohne Cholat schon nach 16 Stunden eine deutliche Sauerstoffaufnahme auf. Ebenso weisen die Kolben 3 und 4, die mit Pyridin und mit Porphyrin + Pyridin beschickt waren, einen deutlichen Mehrverbrauch an Sauerstoff auf, als die Parallelversuche mit der Standardlösung. Aus den Zahlen der Reihen 1 und 2 ist klar zu ersehen, daß die aufgenommene Sauerstoffmenge in allen Versuchen der Reihe 2, die ohne Na-Cholat angesetzt wurden, höher liegen als in den entsprechenden Versuchen der Reihe 1. Demnach hemmt Cholat die Oxydation. Weiter wirkt Porphyrin in Gegenwart von Cholat stärker hemmend.

Reihe 3A. Ansatz: Citratpuffer, Na-Cholat.

Nr. d. Kolbens		1	2	3	4	5	6*
Mischung ccm		30	30	30	30	30	30
Porphyrin mg		—	0,12	—	0,12	—	
Pyridin ccm		—	—	0,3	0,3	—	
Alkohol ccm		—	—	—	—	1	
	Std.						
	15	2	0	16	16	0	41
	23	2	0	25	24	3	49
	43	14	—1	56	56	10	72
	46	18	0	61	64	10	81
	63	37	—1	83	84	18	93
	72	49	0	91	92	38	96
	85	65	1	97	98	42	101
	95	74	1	96	98	52	106
	109	83	1	98	100	67	110
	137	95	2	102	104	77	115
	158	98	2	101	104	—	117
	164	99	2	101	104	—	117
	181	103	4	104	106	89	120

*) K. 6 = Phosphatpuffer + Cholat, dient zum Vergleich.

Zwischen den sine-Werten der Reihe 1 und der Reihe 3 bestehen wesentliche Unterschiede, so ist der Beginn und der Verlauf der Oxydation bei Verwendung von Citratpuffer + Cholat wesentlich langsamer als bei Phosphatpuffer, auch bleibt die Gesamtmenge O_2 hinter der von Reihe 1 zurück. Porphyrin-Zusatz (0,12 mg) hemmt noch absolut nach 181 Stunden. Pyridin, das die Oxydation der Standardlösung deutlich hemmt, übt hier einen aktivie-

renden Einfluß aus. Zusammen mit Porphyrin, ist die Wirkung ähnlich der in Reihe 1 und 2. Alkohol verursacht eine merkbare Hemmung der Oxydation.

Reihe 3B. Ansatz: Citratpuffer, kein Cholat.

Nr. d. Kolbens	1	2	3	4	5	6*
Mischung ccm	30	30	30	30	30	30
Porphyrin mg	—	0,12	—	0,12	—	—
Pyridin ccm	—	—	0,3	0,3	—	
Alkohol ccm	—	—	—	—	1	
Std.						
15	0	1	18	12	1	0
40	18	3	67	58	17	48
60	44	4	82	78	44	78
68	54	6	83	81	47	84
86	68	19	92	90	68	97
94	71	29	93	91	69	100
110	76	50	97	95	78	120
135	83	72	100	98	84	130
158	89	82	102	100	87	130
180	91	87	103	102	91	—
208	93	88	105	104	94	—

*) K. 6 = Phosphatpuffer + Cholat, dient zum Vergleich.

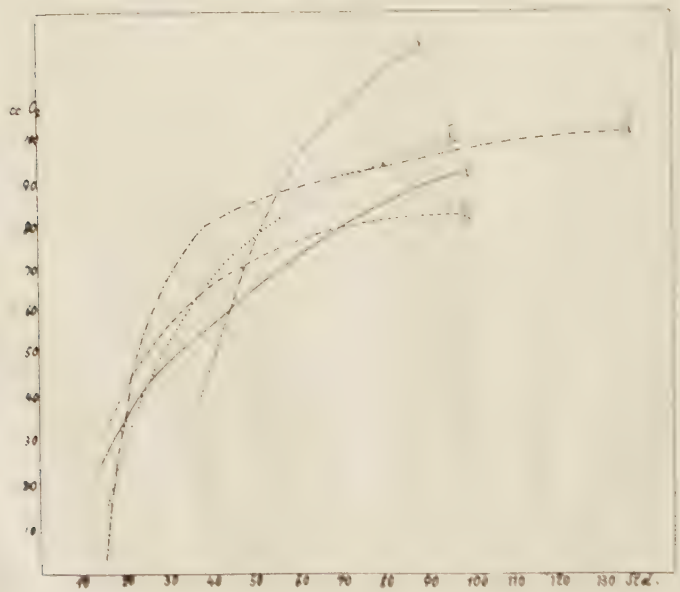
In der Reihe 3B, die der Reihe 3A parallel, aber ohne Cholat angesetzt wurde, ist in allen Versuchen die O_2-Aufnahme geringer als in denen, die mit Cholat angesetzt wurden, mit Ausnahme von Nr. 2. Hier ist auffallend, daß das Porphyrin, das in Gegenwart von Cholat komplett hemmt, nur bis zu 60 Stunden die Oxydation verhindert. Die Kurve des Sauerstoffverbrauchs steigt in den folgenden Stunden steil an und hat nach rund 208 Stunden den sine-Wert fast erreicht. Pyridin aktiviert auch in Nr. 3 wieder, aber noch stärker als in Nr. 3 der Reihe 3A. Das gleiche Verhalten der Sauerstoffkurve ist auch in Nr. 4 zu ersehen, wo die Werte deutlich höher liegen und die Kurve steiler ansteigt als im Parallelversuch mit Cholat. Alkohol hat entsprechende Wirkung und der Verlauf der Oxydation ist wesentlich stärker als im gleichen Versuch der Reihe 3A. Vergleicht man Reihe 3A und B mit den entsprechenden Versuchen der Reihe 1, so sieht man, daß alle Werte und der Anstieg des Sauerstoffverbrauches in

der ersten Reihe bedeutend höher liegen. Betrachtet man dazu die Ansätze, so fällt sofort auf, daß die aufgenommenen O_2-Mengen in den Versuchen, die mit Phosphatpuffer angesetzt waren, größer sind als in denen, die mit Citratpuffer ausgeführt wurden. Außerdem geht der Anstieg des Sauerstoffverbrauchs viel langsamer vor sich, d. h. die Autoxydation von Leinölsäure verläuft in Gegenwart von Citratpuffer viel träger als in gleichen Versuchen mit Phosphatpuffer. Weiter zeigen alle Versuche, die mit Cholat durchgeführt wurden, sowohl in Reihe 1 als auch in Reihe 3, ein deutliches Zurückbleiben der verbrauchten Sauerstoffmengen hinter denen, die ohne Cholat ausgeführt wurden.

Reihe 4. Ansatz: kein Puffer, kein Cholat reine Leinölsäure.

Nr. d. Kolbens	1	2	3	4	5
Leinölsäure g	0,84	0.84	0.84	0.84	0,84
Porphyrin mg	—	0,12	—	0,12	—
Pyridin ccm	—	—	0,3	0,3	—
Alkohol ccm	—	—	—	—	1

Sauerstoffverbrauch siehe Kurve.



Die reine Leinölsäure nimmt langsamer und weniger Sauerstoff auf, als im Verein mit Cholat und Phosphatpuffer. In Kolben Nr. 2 übt das Porphyrin keine Hemmung auf die Oxydation aus wie eigentlich zu erwarten war, sondern hat nach 25 Stunden sogar eine positive katalytische Wirkung. II. Pyridin III. wirkt allein hemmend, zusammen mit Porphyrin IV. aber aktivierend, Alkohol auf die Oxydation der reinen Säure enorm beschleunigend V. Der Unterschied in der Porphyrinwirkung ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß einerseits für die geringen Reaktionsmengen die Versuchskolben zu groß waren und somit keine innige Durchmischung der einzelnen Bestandteile stattfinden konnte, andererseits, daß die wässerige Porphyrinlösung mit der Leinölsäure keine homogene Mischung ergab.

Reihe 5. Ansatz 1: Phosphatpuffer, Na-Cholat · Hämin.

Nr. d. Kolbens	1	2	3	4	5	6
Mischung ccm	30	30	30	30	30	0,84 g Linolsäure
Hämin, gelöst in Pyridin, mg	—	5,0	2,5	0,5	0,25	0,5
Std.						
13	35	1	0	15	8	22
23	48	2	21	23	16	35
41	71	2	76	34	34	50
69	96	32	68	74	77	69
90	104	62	86	94	98	77
96	106	69	89	97	108	78
113	112	88	98	106	108	83
123	113	93	102	109	111	85
136	115	101	106	115	114	88
165	116	110	112	120	119	93
185	121	114	116	123	121	96
196	122	117	118	125	123	98
214	123	118	120	126	123	99

Reihe 5. Ansatz 2: Phosphatpuffer, Na-Cholat.

Nr. d. Kolbens	1	2	3	4	5	6
Mischung ccm	30	30	30	30	30	0,84 g Linolsäure
Hämin, gelöst in Pyridin, mg	—	5,0	2,5	0,5	0,25	0,5
Std.						
13	35	0	0	12	9	27
23	48	2	0	19	16	40
41	71	0	0	29	70	62
69	96	2	1	57	24	87
90	104	3	2	77	97	96
96	106	2	2	81	101	98
113	112	2	1	103	109	104
123	113	1	1	98	112	108
136	115	1	1	103	115	112
165	116	2	2	111	120	117
185	121	2	2	115	122	120
196	122	3	3	118	124	120
214	123	3	7	119	124	122

Die Reihe 5 zeigt in den Ansätzen 1 und 2 das Verhalten der Autoxydation bei Zusätzen von Phosphathämin und Pyridinhämin in verschiedenen Konzentrationen. 5 mg Phosphathämin hemmen anfangs etwas die Sauerstoffaufnahme, haben aber im ganzen keine erhebliche Wirkung. Schwächere Konzentrationen dagegen lassen eine merkliche Steigerung des Sauerstoffverbrauchs erkennen.

2,5 und 5 mg Pyridinhämin hemmen nach 214 Stunden noch vollständig, während 0,5 und 0,25 mg keinen Einfluß auf den Ablauf der Oxydation ausüben.

Auf reine Leinölsäure, Kolben 6, wirkt Pyridinhämin stärker aktivierend ein als Phosphathämin.

Reihe 6. Ansatz 1: Phosphatpuffer, kein Na-Cholat, + Hämin.

Nr. d. Kolbens	1	2	3	4	5
Mischung ccm	30	30	30	30	30
Hämin gelöst in Phosphatpuffer mg	—	5,0	2,5	0,5	0,25
Std.					
13	11	20	20	18	18
23	27	75	36	33	34
41	47	50	50	57	59
69	92	92	92	88	90
90	99	104	103	104	106
96	101	106	109	105	107
113	106	112	112	111	113
123	127	116	116	114	116
136	129	119	119	117	118
165	—	125	125	122	124
185	—	128	128	125	126
196	—	128	128	125	126
214	—	131	131	127	128

Reihe 6. Ansatz 2: Phosphatpuffer, kein Na-Cholat.

Nr. d. Kolbens	1	2	3	4	5
Mischung ccm	30	30	30	30	30
Hämin, gelöst in Pyridin. mg	—	5,0	2,5	0,5	0,25
Std.					
13	11	0	12	18	15
23	27	0	29	32	28
41	47	1	50	54	51
69	92	1	78	84	85
90	99	2	90	97	90
96	101	2	92	100	101
113	106	2	98	107	107
123	127	4	103	111	111
136	129	3	107	114	114
165	—	68	114	120	119
185	—	92	119	124	122
196	—	101	120	124	122
214	—	111	124	126	125

In Reihe 6, die ohne Cholat angesetzt war, ist die vermehrte Sauerstoffaufnahme, bedingt durch das fehlende Cholat, gegenüber Reihe 5, sehr deutlich. Der O_2-Verbrauch liegt sowohl beim Phosphathämin als auch beim

Pyridinhämin wesentlich höher als in Reihe 5; dort ist die ausgesprochene Hemmung des Pyridinhämins in Anwesenheit der Cholsäure erheblich kräftiger.

Reihe 7. Ansatz 1: Citratpuffer, Na-Cholat.

Nr. d. Kolbens		1	2	3	4	5
Mischung ccm		30	30	30	30	30
Hämin, gelöst in Phosphatpuffer mg		—	5,0	2,5	0,5	0,25
	Std.					
	16	2	2	10	8	8
	41	14	2	26	14	19
	46	18	3	29	16	23
	60	36	4	32	19	71
	68	44	3	35	21	38
	84	65	4	38	28	51
	94	74	20	41	32	58
	109	83	42	45	41	68
	136	95	56	52	59	79
	150	97	64	59	73	84
	171	100	70	64	70	87
	178	103	73	67	73	88
	194	—	76	71	76	90
	200	—	76	70	76	89

Reihe 7. Ansatz 2: Citratpuffer, Na-Cholat.

Nr. d. Kolbens		1	2	3	4	5
Mischung ccm		30	30	30	30	30
Hämin, gelöst in Pyridin. mg		—	5,0	2,5	0,5	0,25
	Std.					
	5	0	0	1	6	5
	21	2	1	2	11	8
	45	15	1	1	13	9
	56	29	0	1	13	10
	73	49	2	2	15	10
	99	75	1	2	16	18
	124	86	0	1	18	34
	150	97	1	2	23	64
	197	101	1	3	42	92
	219	—	3	21	55	97
	246	—	3	26	62	99
	258	—	4	28	65	100

Reihe 7 zeigt die Wirkung von Phosphathämin und Pyridinhämin in Citratpuffer in Gegenwart von Cholat. Der Reaktionsverlauf ist hier träger und die verbrauchten

Sauerstoffmengen sind geringer als in Reihe 5 mit Phosphatpuffer. Auch ist die Pyridinhämin-Wirkung wieder viel ausgeprägter.

Reihe 8. Ansatz 1: Citratpuffer, kein Na-Cholat.

Nr. d. Kolbens		1	2	3	4	5
Mischung ccm		30	30	30	30	30
Hämin, gelöst in Phosphatpuffer mg		—	5,0	2,5	0,5	0,25
	Std.					
	16	0	18	24	19	16
	41	18	56	50	50	39
	46	22	62	54	55	44
	60	44	79	68	67	57
	68	54	84	75	72	63
	84	67	92	84	80	73
	94	71	94	97	82	75
	109	76	94	91	85	79
	136	83	98	97		86
	150	88	102	101		94
	171	90	102	102		92
	178	91	103	101		92
	194	93	104	104		93
	200	93	104	103		93
	218	94	104	104		94

Reihe 8. Ansatz 2: Citratpuffer, kein Na-Cholat.

Nr. d. Kolbens		1	2	3	4	5
Mischung ccm		30	30	30	30	30
Hämin gelöst in Pyridin. mg		—	5,0	2,5	0,5	0,25
	Std.					
	5	0	1	1	9	7
	21	4	1	26	28	21
	26	8	1	38	12	25
	45	21	2	63	50	43
	56	37	1	71	59	52
	73	58	1	79	72	65
	99	79	2	86	82	77
	124	81	1	90	88	84
	150	88	1	94	93	89
	173	90	1	97	96	93
	197	93	2	99	99	07
	219	94	2	100	100	98
	246	—	25	101	101	100
	258	—	46	101	102	102
	269	—	50	102	102	103

Auch in Reihe 8 ist der Reaktionsverlauf wieder träge, wie zu erwarten war. Doch liegen sowohl beim Phosphathämin als auch beim Pyridinhämin alle Werte höher als in den entsprechenden Versuchen der Reihe 7, was auf den Wegfall der hemmenden Wirkung der Cholsäure zurückzuführen ist.

Die Versuche haben ergeben, daß für die katalytische Wirkung der einzelnen Komponenten das Milieu des Reaktionsgemisches von ausschlaggebender Bedeutung ist. Es war mit Ausnahme der Reihe 4 in allen Versuchen die Wasserstoffionenkonzentration bis auf geringfügige Schwankungen zu Beginn des Versuches gleich und es zeigt sich, daß die Gegenwart von Phosphatpuffer, Pyridin und Alkohol nur einen geringen Einfluß hat, daß aber Hämatoporphyrin besonders in Gegenwart von Cholsäure sehr stark hemmt. Dagegen bleibt die Porphyrinwirkung bei Gegenwart von Cholat und Alkohol und Pyridin vollkommen aus, während Porphyrin und Pyridin ohne Zusatz von Cholat genau so wirkt wie Porphyrin allein. Immerhin muß betont werden, daß in Gegenwart von Cholat Porphyrin offenbar stärker wirkt. Bei Citratpuffer ist die Porphyrinwirkung wesentlich stärker und auch hier wieder besonders ausgeprägt in Gegenwart von Cholsäure. Pyridin + Porphyrin beschleunigen die Autoxydation, und Alkohol hemmt deutlich. Bei reiner Leinölsäure finden wir bei 0,12 mg Porphyrin keine Hemmung mehr. Pyridin hat in den ersten Versuchsstunden eine beschleunigende Wirkung, die aber gegen Ende des Versuches in eine Hemmung umschlägt, die zwar geringfügig ist, aber deutlich erkannt werden kann. Dies steht bezüglich des Versuchsanfanges in Uebereinstimmung mit Franke, der innerhalb der ersten 2 Stunden eine fast 100 %ige Steigerung findet, dessen Versuche aber nicht lange genug durchgeführt wurden, um die Wirkung gegen Ende der Autoxydation beobachten zu können.

Das Hämin + Phosphatpuffer + Cholsäure ist in Mengen von 2,5—5 mg ohne erhebliche Wirkung, bei den kleineren Konzentrationen findet sich, wie es schon Hinsberg und Ammon beschrieben haben, eine leichte Steigerung.

Dasselbe ist auch in Abwesenheit von Cholsäure der Fall, während sich hier in Gegenwart von Pyridin, welches selbst keine Wirkung hat, eine ausgesprochene Hemmung zu erkennen gibt, die besonders kräftig in Abwesenheit von Cholsäure zu bemerken ist. In Citratpuffer ergibt sich dasselbe Bild, graduell etwas abgestuft, aber wieder die bemerkenswerte Tatsache, daß durch den Zusatz von Pyridin die katalytische Wirkung vollkommen aufgehoben werden kann, ja man könnte stellenweise sogar von Umkehrung reden, da sicher auch eine geringe beschleunigende Wirkung neben der oft beobachtenden kompletten Hemmung in Frage kommt.

Eine große Reihe von ähnlichen Verbindungen, wie z. B. das α-α-Dipyridil, das Prolin, Histamin und Piperidin hat bereits Franke studiert, worauf eingangs schon kurz hingewiesen wurde. Allein, seine Versuche sind teilweise kurzfristig und mit freier Leinölsäure, gelöst in Alkohol oder in Wasser suspendiert, angestellt. Und sie sind deshalb mit den oben beschriebenen Versuchen nicht zu vergleichen. Nachdem aber in sehr vielen Untersuchungsreihen dargetan worden ist, welch großen Einfluß die verschiedensten Zusätze und die Acidität des Reaktionsgemisches haben, ist es wohl klar, daß gegensätzliche Befunde sich durch die Unterschiede in der Versuchsanordnung eindeutig klären lassen. Während z. B. Pyridin unter bestimmten Bedingungen zu Anfang des Versuches fördernd auf die Autoxydation wirkt, kann es gegen Ende der Sauerstoffaufnahme hemmend wirken. Deshalb sind nicht nur Versuche miteinander vergleichbar, die unter denselben Bedingungen angestellt wurden, sondern auch nur solche, bei denen die gleiche Reaktionsdauer verfolgt wurde. Als wesentliches Moment und Ergebnis der Versuchsreihe ist aber noch hervorzuheben, daß das Studium der Autoxydation der Fettsäuren unter der Wirkung biologischer Katalysatoren für das Studium des Fettsäureumsatzes für den Organismus von beachtlicher Bedeutung zu sein scheint.

Herrn Prof. Dr. Hinsberg möchte ich an dieser Stelle für seine gütige Anregung und Hilfe ergebenst danken.

Schrifttum.

Franke: Z. physiol. Chemie **212**, 234, 1932.
— Ann. d. Chemie **498**, 129. 1932.
Franke u. Jerchel: Ann. d. Chemie **533**, 46, 1937.
Hinsberg u. Ammon: Z. physiol. Chemie, **246**, 139, 1937.
Hinsberg u. Holland: Z. exp. Med., **94**, 471, 1934.
Kuhn u. Meyer: Z. physiol. Chemie **185**, 139, 1937.
Olcott: J. aceric. Chem. Soc. **56**, 2492, 1934.
Robinson: Bioch. Jl. **18**, 255, 1924.
Skraup: Chem. Zeitg. 1935, 65.
— Z. angew. Chemie, 1934, 274.

Lebenslauf.

Ich wurde am 21. Juni 1913 zu Berlin geboren als Sohn des Reichsbahnbeamten Georg Lahn und seiner Ehefrau Anna, geb. Conrad. Von 1919 bis 1932 besuchte ich das Jahn-Realgymnasium in Berlin-Lichtenberg das ich nach bestandener Reifeprüfung im Februar 1932 verließ, um mich dem Medizinischen Studium zuzuwenden. Ich studierte vom Sommer-Semester 1932 ab an der Universität Berlin, wo ich auch im Februar 1938 das medizinische Staatsexamen bestand.